

⑤

Int. Cl.:

A 61 k, 17/00

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DEUTSCHES PATENTAMT



⑥

Deutsche Kl.:

30 h, 2/04

42 I, 3/54

⑩

Offenlegungsschrift 2202441

⑪

Aktenzeichen: P 22 02 441.5

⑫

Anmeldetag: 19. Januar 1972

⑬

Offenlegungstag: 1. März 1973

Ausstellungspriorität: —

⑭

Unionspriorität

⑮

Datum: 24. August 1971

⑯

Land: V. St. v. Amerika

⑰

Aktenzeichen: 174517

—

⑧ Bezeichnung: Barbitursäureantigene und spezifische Antikörper hierfür

—

⑩ Zusatz zu: —

—

⑪ Ausscheidung aus: —

—

⑫ Anmelder: F. Hoffmann-La Roche & Co., AG, Basel (Schweiz)

Vertreter gem. § 16 PatG: Werth, A. van der, Dr.-Ing.; Lederer, F., Dipl.-Chem. Dr.; Patentanwälte, 2000 Hamburg und 8000 München

—

⑬ Als Erfinder benannt: Spector, Sidney, Livingstone, N. J. (V. St. A.)

—

⑭ Rechercheantrag gemäß § 28 a PatG ist gestellt

⑮ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht zu ziehende Druckschriften:

DT 2202441

ATTORNEY DOCKET NUMBER: 11662-003-999
SERIAL NUMBER: 10/647,071

REFERENCE: B02

⊕ 2.73 309 809/1143

11/90

51

Int. Cl.:

A 61 k, 17/00

G 01 n, 33/16

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DEUTSCHE PATENTAMT

52

Deutsche Kl.: 30 h, 2/04
42 l, 3/54

10

Offenlegungsschrift 2202441

11

Aktenzeichen: P 22 02 441.5

21

Anmeldetag: 19. Januar 1972

22

Offenlegungstag: 1. März 1973

43

Ausstellungsriorität: —

30

Unionspriorität

32

Datum: 24. August 1971

33

Land: V. St. v. Amerika

31

Aktenzeichen: 174517

54

Bezeichnung: Barbitursäureantigene und spezifische Antikörper hierfür

61

Zusatz zu: —

62

Ausscheidung aus: —

71

Anmelder: F. Hoffmann-La Roche & Co., AG, Basel (Schweiz)

Vertreter gem. § 16 PatG: Werth, A. van der, Dr.-Ing.; Lederer, F., Dipl.-Chem. Dr.; Patentanwälte, 2000 Hamburg und 8000 München

72

Als Erfinder benannt: Spector, Sidney, Livingstone, N. J. (V. St. A.)

56

Rechercheantrag gemäß § 28 a PatG ist gestellt

Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht zu ziehende Druckschriften:

DT 2202441

PATENTANWÄLTE

DR. ING. A. VAN DER WERTH

21 HAMBURG 90

WILSTORFER STR. 32 • TEL. 104 111 77 08 61

DR. FRANZ LEDERER

8 MÜNCHEN 80

LUCILE-GRAHN-STR. 22 • TEL. 106 111 47 29 47

2202441

München, 19. Januar 1972
RAN 4050/4

F. Hoffmann-La Roche & Co. Aktiengesellschaft, Basel / Schweiz

"Barbitursäureantigene und spezifische Antikörper hierfür"

Barbitursäureantigene werden durch Verknüpfung von 5- oder 5,5-substituierter Barbitursäure mit immunisierenden Trägerstoffen hergestellt. Vorzugsweise werden als Trägerstoffe Proteine verwendet und die Verknüpfung wird durch eine Amidbindung zwischen dem in 5-Stellung stehenden Substituenten der Barbitursäure und einer Carboxyl- oder Aminogruppe des Proteins bewirkt. Werden die erhaltenen Antigene Wirtstieren injiziert, so bewirken sie immunologische Effekte, einschließlich der Bildung gegenüber 5- und 5,5-substituierten Barbitursäuren spezifischer Antikörper. Diese spezifischen Antikörper lassen sich in bioanalytischen Verfahren zum Nachweis von Barbitursäuren in biologischen Flüssigkeiten verwenden.

309309/1143

Das starke Anwachsen des Gebrauchs von Sedativa, einschließlich Barbitursäuren, in der breiten Bevölkerung bedingt ein starkes Bedürfnis zur Verbesserung der analytischen Verfahren für den Nachweis der Sedativa in biologischen Flüssigkeiten. In vielen Fällen sehen sich die Krankenfürsorgeeinrichtungen der Notwendigkeit gegenüber, die Identität eines von einem Patienten eingenommenen Sedativum zu bestimmen, während sich der Patient in komatösem Zustand befindet und somit dem behandelnden Arzt keine Information geben kann. Darüber hinaus kommt in letzter Zeit dem Arzneimittelmißbrauch, insbesondere dem Mißbrauch von Sedativa, wie Barbitursäurederivaten, eine große Bedeutung zu.

Gegenwärtig bestehen die Verfahren zur Identifizierung von Barbitursäurederivaten in der Extraktion und Dünnschichtchromatographie. Diese Verfahren besitzen jedoch den Nachteil, daß sie relativ zeitraubend sowie arbeitsaufwendig sind und darüber hinaus keine große Empfindlichkeit aufweisen. Ein schnellerer und hochempfindlicher Nachweis für Barbitursäurederivate in biologischen Flüssigkeiten würde somit einen besonders bedeutenden Fortschritt darstellen.

Es ist seit einiger Zeit bekannt, daß verschiedene kleine Moleküle (Haptene), die selbst keine Antigenizität aufweisen, die Antigeneigenschaften eines Proteins verändern können, wenn das kleine Molekül mit dem Protein durch stabile kovalente Bindungen verknüpft wird. Gemäß der US-PS 2 372 066 können Antigene so hergestellt werden, daß Histamin oder Histaminähnliche Verbindungen durch Verknüpfung des Imidazolirings

über einen Rest, der eine für die Verknüpfung mit dem Protein reaktionsfähige Gruppe enthält, mit dem Protein verknüpft werden. Diese Antigene werden entweder direkt injiziert, wodurch die Widerstandsfähigkeit, die Widerstandskraft oder aktive Immunität des Subjekts entwickelt werden, oder Wirtstieren injiziert, von denen spezifische Antikörper entwickelt werden, die spezifisch hinsichtlich des Haptenrestes, z.B. des Histamins oder der Histamin-ähnlichen Verbindung, sind.

Eine ähnliche, gleichzeitige Offenbarung wurde von Landsteiner in "Specificity of Serological Reactions", Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 1945, gemacht. Hierbei wurde p-Aminophenylarsinsäure mit einem Protein über dessen Diazoniumsalz zu einer chemisch einfachen, gut definierten Verbindung gekuppelt, die antigene Eigenschaften besaß und die Bildung von Antikörpern stimulierte. Darüber hinaus können die Antikörper dieses Immunogen (konjugiertes Protein) mit den kleinen Molekülen, z.B. der Arsinsäure, die mit keinem Protein verbunden ist, kombinieren. Dieser Antikörper ist in der Aktivität sehr spezifisch. Wird z.B. ein Isomeres der Arsanilsäure verwendet, in der sich die $-AsO_3H_2$ Gruppe in m-Stellung zur Amino-gruppe befindet, so wird dieses nicht mit dem Antikörper kombinieren, der für einen Protein-Arsanilsäurekomplex gebildet worden ist, in dem sich die $-AsO_3H_2$ Gruppe in p-Stellung zur Amino-gruppe befindet.

Es sei darauf hingewiesen, daß es beim derzeitigen Stand der Forschung noch nicht möglich ist, diejenigen Eigenschaften eines Moleküls vorauszusagen oder zu bestimmen, die das Mole-

kül dazu befähigen, als Antigen zu wirken. Man hat einmal angenommen, daß das Molekulargewicht und die Anwesenheit einer aromatischen Gruppe die entscheidenden Faktoren sind. Mit der Zeit hat sich die Forderung nach einem bestimmten Molekulargewicht als Bedingung für die Antigenizität beträchtlich verringert. Man ist jedoch noch der Auffassung, daß das Molekulargewicht in gewissem Umfang die antigenen Fähigkeiten eines Moleküls beeinflußt. Auch andere Faktoren, wie die molekulare Gestalt und die chemische Reaktivität, müssen eine Rolle bei den Antigeneigenschaften spielen. Auf diese Weise wird eine Vorhersage über diese Eigenschaften noch erheblich schwieriger.

Die vorliegende Erfindung betrifft eine neue Klasse von Antigenen, die einen 5- oder 5,5-substituierten Barbitursäure-Haptenrest, der mit einem immunisierenden Trägerstoff verknüpft ist, enthalten. Vorzugsweise ist das Barbitursäurederivat kovalent mit einem Protein- oder Polypeptidmolekül über eine Peptidbindung verbunden. An dieser Peptidbindung sind entweder eine an einem 5-Substituenten des Barbitursäurerestes stehende Carboxylgruppe und eine Aminogruppe der Protein- oder Polypeptidkette, oder eine am 5-Substituenten des Barbitursäurerestes stehende Aminogruppe und eine an der Protein- oder Polypeptidkette stehende Carboxylgruppe beteiligt. Darüber hinaus betrifft die vorliegende Erfindung Antikörper, die mit gewisser Spezifität mit den 5- oder 5,5-substituierten Barbitursäure-Haptenen Komplexe bilden. Diese Antikörper werden dadurch hergestellt, daß man Wirtstiere mit den vorgenannten Antigenen behandelt. Die spezifischen Antikörper lassen sich in einfacher

Weise aus den von den Wirtstieren nach der Behandlung mit dem Antigen gewonnen Seren isolieren.

Der hier verwendete Ausdruck "immunisierender Trägerstoff" umfaßt solche Stoffe, die bei ihrer Injizierung in Wirtstiere selbständig eine immunisierende Reaktion im Wirtstier hervorrufen und die mit dem vorgenannten Barbitursäure-Hapten unter Ausbildung kovalenter Bindungen verknüpft werden können. Geeignete Trägerstoffe sind z.B. Proteine, natürliche oder synthetische polymere Stoffe, wie Polypeptide, z.B. Polylysin oder Polyglutaminsäure, oder Polysaccharide. Bei der Anwendung der Erfindung in der Praxis werden als Trägerstoffe vorzugsweise Proteine und Polypeptide, insbesondere Proteine, verwendet.

Die Art des zur Herstellung eines bevorzugten Antigens verwendeten Proteins spielt keine besondere Rolle. Beispiele für bevorzugte Proteine sind Säugetiere-Serumproteine, wie menschliches γ -Globulin, menschliches Serumalbumin, Rinderserumalbumin, Kaninchenserumalbumin oder Rinder- γ -Globulin. Es liegt im Vermögen des Fachmanns, weitere geeignete Proteine zu verwenden. Im allgemeinen wird es bevorzugt, solche Proteine zu verwenden, die für das mit dem Antigen zu behandelnde Wirtstier artfremd sind.

Für die Herstellung der erfindungsgemäßen Antigene geeignete Barbitursäurederivate sind in 5-Stellung mono- oder disubstituiert und tragen an den Stickstoffatomen in 1- und 3-Stellung keine Substituenten. Ferner muß sich an dem in 5-Stellung stehenden Substituenten der vorgenannten Barbitursäure mindestens eine Carboxyl- oder Aminogruppe befinden, die zur Verknüpfung.

mit dem immunisierenden Trägermaterial dient. Beispiele für in 5-Stellung der Barbitursäure stehende Substituenten sind geradkettige oder verzweigte Alkylreste, wie die Methyl-, Äthyl-, n-Butyl-, Isobutyl-, n-Hexyl-, Isopropyl-, sek.-Butyl-, β -Pentyl-, α -Methyl-butyl-.. oder α,γ -Dimethyl-butylgruppe, Cycloalkylreste, wie die Cyclopentyl- oder Cyclohexylgruppe, Arylreste, wie die Phenylgruppe, Alkenylreste, wie die Allyl- oder Methallylgruppe, Carboxy-substituierte geradkettige oder verzweigte Alkylreste, wie die Carboxy-methyl-, β -Carboxy-äthyl-, β -Carboxy- α -methyl-äthyl-, β -Carboxy- α,β,β -trimethyl-äthyl-, β -Carboxy- β -äthyl- α -methyl-äthyl-, γ -Carboxy- α -methyl-propyl- oder α,β -Dicarboxy-äthylgruppe, Carboxy-substituierte Cycloalkylreste, wie die 2-Carboxy-cyclopentyl- oder 2-Carboxy-cyclohexylgruppe, oder Carboxy-substituierte Aralkylreste, wie die p-Carboxy-benzyl- oder p-Carboxy- α -methyl-benzyl-gruppe.

Barbitursäurederivate, deren Substituenten eine Aminofunktion anstelle der Carboxylfunktion aufweisen, können aus den entsprechenden Carboxyverbindungen nach einer Anzahl von Verfahren z.B. dem Hoffmann-, Curtius- oder Schmidt-Abbau hergestellt werden. Barbitursäuren, die eine Aminogruppe an der in 5-Stellung stehenden Seitenkette enthalten, können auch aus der Carboxyverbindung durch Umsetzung mit einem Diaminderivat, wie p-Phenyldiamin, hergestellt werden. In diesem Fall wird die Carboxylgruppe durch Verknüpfung mit einer Aminogruppe des Diaminrestes in eine Amidbindung überführt. Die andere Aminogruppe kann dazu dienen, in nachfolgend beschriebener Weise eine Amidbindung mit der Carboxylgruppe eines Proteins oder Poly-

peptids auszubilden.

Die Verknüpfung des Barbitursäure-Haptens mit dem Protein zur Herstellung des erfindungsgemäßen Antigens kann in einfacher Weise nach bekannten Verfahren der Proteinchemie zur Herstellung von Peptidbindungen durchgeführt werden. Nach einem Verfahren werden z.B. das Protein und ein Dehydratisierungsmittel nach dem Lösen in einem geeigneten Lösungsmittel mit einem großen molaren Überschuß des gewünschten Barbitursäure-Haptens versetzt. Die Reaktion kann bei Temperaturen im Bereich von etwa 0 bis etwa 50°C durchgeführt werden. Nach Maßgabe der Art der Reaktanten und der Denaturierungs temperatur des Proteins können jedoch auch höhere oder niedrigere Temperaturen angewendet werden. Ein besonders bevorzugter Temperaturbereich erstreckt sich von etwa 0°C bis etwa Raumtemperatur. Es ist von Vorteil, ein schwach saures Reaktionsmedium, z.B. mit einem pH-Wert im Bereich von etwa 3 bis 6,5, insbesondere im Bereich von etwa 4 bis 6,5, zu verwenden. Nach Vervollständigung der Reaktion können die überschüssigen Haptenmoleküle und das Dehydratisierungsmittel durch Dialyse entfernt werden. Der Fortschritt der Dialyse kann so kontrolliert werden, daß man das Dialysat auf die Anwesenheit von Hapten oder Dehydratisierungsmittel prüft. Die Dialyse kann jedoch auch einfach eine bestimmte Zeit, z.B. 3 Tage, durchgeführt werden. Das gereinigte Antigen wird als Rückstand im Dialysesack gewonnen.

Das bei der vorgenannten Reaktion verwendete Dehydratisierungsmittel wird aus den üblicherweise in der Peptidchemie zur Bildung von Peptidbindungen verwendeten Dehydratisierungsmitteln

ausgewählt. Eine besonders geeignete Gruppe von Dehydratisierungsmitteln umfaßt die Carbodiimide, insbesondere Dicyclohexylcarbodiimide oder 1-Äthyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid . Die Menge des molaren Überschusses des Haptens über das Protein in der vorgenannten Reaktion hängt selbstverständlich von der Art des für die Reaktion ausgewählten Haptens und Proteins ab. Im allgemeinen wird ein molarer Überschuß im Bereich von etwa 100 bis 1000, insbesondere im Bereich von etwa 500 bis 1000, angewendet. Es wird allgemein beobachtet, daß sich etwa 2 bis etwa 3 Barbitursäurederivatreste an 1 Molekül des Proteins nach Maßgabe des molaren Überschusses des verwendeten Haptens anlagern.

Ein anderes nützliches Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Antigene besteht darin, daß man zunächst ein aktiviertes Derivat der Carboxylgruppe des Haptenrestes herstellt und dann dieses aktivierte Derivat mit dem Protein unter Bildung des gewünschten Antigens umsetzt. Geeignete aktivierte Derivate sind z.B. aktivierte Ester, wie p-Nitrophenylester, oder Acylimidazole. Die aktivierten Esterderivate werden zweckmäßig durch Umsetzung der freien Säure mit dem gewünschten Alkohol in Gegenwart eines geeigneten Dehydratisierungsmittels, wie eines Carbodiimids, unter den vorgenannten Reaktionsbedingungen ähnlichen Bedingungen hergestellt. Die Acylimidazole können durch Umsetzung der freien Carboxylgruppe mit z.B. Carboylimidazol hergestellt werden.

Zur Herstellung des Antigens kann das aktivierte Derivat mit dem gewünschten Protein in Berührung gebracht werden. Wie be-

reits erwähnt, wird das Antigen im allgemeinen durch Dialyse gereinigt.

Die Antigene der Erfindung können auch so hergestellt werden, daß man Barbitursäure-Haptene, die eine freie Aminogruppe aufweisen, mit der Carboxylgruppe eines Proteins zur Reaktion bringt. Das hierbei angewendete Verfahren ist dem vorgenannten Verfahren identisch, mit der Ausnahme, daß aktivierte Derivate der freien Carboxylgruppen des Proteins hergestellt und dann mit dem das Amin enthaltenden Hapten umgesetzt werden.

Die erfindungsgemäßen Antigene können auch aus freie Carboxyl- oder Aminogruppen enthaltenden Polypeptiden, in gleicher Weise wie für beschrieben, unter Anwendung des Carbodiimid-Dehydratisierungsverfahrens hergestellt werden. Ein geeignetes, freie Carboxylgruppen enthaltendes Polypeptid ist z.B. Poly-L-glutaminsäure. Ein geeignetes, freie Aminogruppen aufweisendes Polypeptid ist z.B. Poly-L-lysin.

Ein weiteres Verfahren zur Herstellung von Antigenen aus Polypeptiden als Trägerstoffen besteht darin, daß man zunächst ein eine freie Aminogruppe aufweisendes Barbitursäure-Hapten mit einem Polyester eines Polypeptids, der seitenständige Carboxylgruppen enthält, wie Poly- β -benzyl-L-glutamat, nach bekannten Verfahren unter Bildung der neuen Polypeptidbindung umsetzt.

Bei Anwendung dieses Verfahrens kann ein großes Verhältnis von Hapten zu Trägerstoff erreicht werden. So läßt sich z.B. bei Verwendung von Poly- β -benzyl-L-glutamat 1 Molekül Aminohapten pro Aminosäurerest in der Polypeptidkette einführen, so daß eine große Anzahl aktiver Zentren zur Verfügung steht, die die

Antikörperbildung induzieren. Die Anzahl der aktiven Zentren lässt sich gegebenenfalls variieren, indem man einen Trägerstoff verwendet, der ein Copolymerisat einer eine Seitenständige Carboxylgruppe enthaltenden Aminosäure mit einer anderen, keine Seitenständige Carboxylgruppe enthaltenden Aminosäure darstellt. Ein Beispiel hierfür ist ein Copolymerisat aus Glutaminsäure und Lysin. In einem solchen Copolymerisat kann das Verhältnis von z.B. Glutaminsäure zu Lysin in gewünschter Weise geregelt werden.

Das Antigen der Erfindung kann dazu verwendet werden, um die Bildung von gegenüber 5- und 5,5-substituierten Barbitursäuren im Serum von Wirtstieren zu induzieren, indem man das Antigen diesen Wirtstieren über einen gewissen Zeitraum wiederholt injiziert, das Serum sammelt, den Antikörper mit einer neutralen Salzlösung ausfällt und anschließend durch Dialyse und Säulenchromatographie reinigt. Geeignete Wirtstiere sind z.B. Säugetiere, wie Kaninchen, Pferde, Ziegen, Guinea-Schweine, Ratten, Rinder oder Schafe. Die erhaltenen Antikörper besitzen eine Vielzahl aktiver Zentren, die selektiv entweder mit der substituierten Barbitursäure oder dem hiermit hergestellten Antigen in vorgenannter Weise unter Komplexbildung reagieren.

Die Bildung substituierter Barbitursäure-spezifischer Antikörper in den Wirtstieren lässt sich durch Blutprobenentnahmen und Versetzen dieser Blutproben mit dem Barbitursäure-Protein-Antigen kontrollieren. Die Ausbildung eines Niederschlags zeigt die Antikörperaktivität an. Die Antigenbehandlung des Tieres kann so lange fortgeführt werden, bis der Antikörpertiter die ge-

wünschte Aktivitätshöhe erreicht. Für die Zwecke dieser Erfindung stellt der Antikörpertiter die Maximalkonzentration an ausgefällttem Protein dar, die sich aufgrund der Zugabe verschiedener bekannter Konzentrationen von Antigen zu bestimmten Volumina von Serum, z.B. 0,5 ml, ergibt.

Die Barbitursäure-spezifischen Antikörper können aus den Seren der behandelten Wirtstiere unter Verwendung von in der Biochemie bekannten Verfahren isoliert werden. Zum Beispiel können die gewünschten Barbitursäure-spezifischen Antikörper aus den Seren mittels neutraler Salze ausgefällt werden. Für diesen Zweck geeignete neutrale Salze sind z.B. Natriumsulfat, Magnesiumsulfat Natriumhydrogenphosphatgemische oder Ammoniumsulfat. Ammoniumsulfat wird bevorzugt. Gegebenenfalls können sich der Ausfällung Reinigungsverfahren, wie Dialyse oder Säulenchromatographie, anschließen. Bei den so erhaltenen Antikörpern handelt es sich um γ -Globuline mit einem Molekulargewicht von etwa 160 000. Diese Antikörper reagieren in vorgenannter Weise mit Barbitursäure-Haptenen und Barbitursäure-Antigenen unter Komplexbildung.

Die spezifischen Antikörper der Erfindung stellen wertvolle Reagenzien zum biochemischen Nachweis von 5- und 5,5-substituierten Barbitursäurederivaten in biologischen Flüssigkeiten dar. Ein besonders bevorzugtes Nachweisverfahren besteht in einem Immuno-Ausfällungsverfahren, das zum Nachweis von Nanogrammmengen Barbitursäurederivaten im Serum oder im Urin verwendet werden kann. Bei diesem Verfahren wird eine bestimmte Menge markiertes Barbitursäurederivat mit dem Barbitursäure-spezifi-

schen Antikörper und einer Probe, die die unbekannte Menge an Barbitursäurederivat enthält, vermischt. Die Menge des in der Probe vorhandenen Barbitursäurederivats kann bestimmt werden, indem man das Ausmaß der konkurrierenden Inhibierung beobachtet, die zwischen der Bindung des markierten Barbitursäurederivats und des Barbitursäurederivats aus der Probe mit dem Barbitursäure-spezifischen Antikörper stattfindet und anschließend die Menge des Barbitursäurederivats in der Probe aus einer Standardkurve berechnet. Für diesen Zweck geeignete markierte Barbitursäurederivate sind z.B. Isotopen-markierte Barbitursäurederivate, insbesondere ^{14}C -markierte, sowie mit einer Elektronenspinresonanzgruppe markierte Barbitursäurederivate. Beispiele für die Verwendung verschiedener Elektronenspinresonanz-markierter Moleküle in biochemischen Analysenverfahren sind in den US-PS 3 453 288, 3 481 952 und 3 507 876 beschrieben.

Die erfindungsgemäß hergestellten Antikörper sind spezifisch für Haptene und Antigene, in denen der Barbitursäurering in 5-Stellung mono- oder disubstituiert ist. Beispiele für solche Barbitursäuren sind Barbital, Pentobarbital und Phenobarbital. Der Antikörper kann nicht zwischen Barbitursäuren unterscheiden, die in 5-Stellung verschiedene Substituenten tragen. Wenn das Barbitursäure-Ringsystem einen oder mehrere Substituenten an den Stickstoffatomen in 1- und 3-Stellung enthält, wird die Bindung dieser Haptene oder der hieraus abgeleiteten Antigene an den Antikörper sehr stark erniedrigt, so daß sich diese Barbitursäurederivate in einfacher Weise von den vorgenannten Barbitursäurederivaten unterscheiden lassen, indem man die Analyse

bei einer Verdünnung durchführt, bei der nur eine geringe oder überhaupt keine Bindung stattfindet. Wenn das Barbitursäure-Ringsystem, z.B. durch Änderung der Ringgröße, geändert wird, findet keine Bindung an den Antikörper statt. Dies zeigt, daß das Verfahren der Erfindung die Bestimmung äußerst geringer Mengen von 5- und 5,5-substituierten Barbitursäurederivaten mit hoher Spezifität erlaubt.

Die neuen Antigene und Antikörper der Erfindung können in Verbindung mit üblichen Zusatzstoffen, Puffern, Stabilisatoren, Verdünnungsmitteln oder in Verbindung mit anderen physiologisch aktiven Stoffen verwendet werden. Die Herstellung und Verwendung von Gemischen, die Antigene oder Antikörper in Verbindung mit pharmakologisch verträglichen Hilfsstoffen enthalten, ist bekannt.

Die Beispiele erläutern die Erfindung.

B e i s p i e l 1

Herstellung des Antigens

Aus 5-(β -Carboäthoxy- α -methyl-äthyl)-barbitursäure wird durch Umsetzung mit Allylbromid bei 50°C 5-Allyl-5-(β -carboäthoxy- α -methyl-äthyl)-barbitursäure vom F. 114°C hergestellt. Bei der alkalischen Verseifung dieser Verbindung erhält man die 5-Allyl-5-(β -carboxy- α -methyl-äthyl)-barbitursäure, die nach dem Umkristallisieren aus Wasser bei 200°C schmilzt.

Analyse C₁₀H₁₄N₂O₅ :

	<u>C</u>	<u>H</u>
ber.:	51,96	5,55
gef.:	52,10	5,32

10 mg 5-Allyl-5-(β -carboxy- α -methyl-äthyl)-barbitursäure werden in 0,5 ml Dimethylformamid (DMF) gelöst und zunächst mit einer Lösung von 5 mg Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in 0,5 ml DMF und anschließend mit einer Lösung von 12 mg p-Nitrophenol in 0,5 ml DMF bei 4°C versetzt. Nach dem Stehenlassen über Nacht bei dieser Temperatur wird das Gemisch zur Trockne eingedampft und in 1,5 ml eines 1 : 1 Glycerin-Wasser-Gemisches gelöst. Nach der Zugabe von 20 mg Rinderserumalbumin lässt man das Gemisch 8 Stunden bei Raumtemperatur und dann über Nacht bei 4°C reagieren. Das Produkt wird dann 2 Tage gegen destilliertes Wasser dialysiert, um nicht umgesetztes Barbitursäurederivat und p-Nitrophenol, das aus der Barbitursäure durch das Protein in Freiheit gesetzt worden ist, zu entfernen. Hierbei erhält man das Rinderserumalbumin-Barbitursäure-Antigen. Aus dem Extinktionskoeffizienten der Absorbtion bei 202 m μ berechnet sich der Substitutionsgrad zu 2 bis 3 Mol Barbiturat pro Mol Protein.

Nach dem gleichen Verfahren wird unter Verwendung von Kinder- γ -Globulin als Protein ein Antigen hergestellt.

B e i s p i e l 2

Herstellung des Antikörpers

Neuseeland-Albinokaninchen werden mit 1 mg gemäß Beispiel 1 hergestelltem Barbitursäure-Rinder- γ -Globulin-Antigen immuniisiert. 100 μ g dieses Antigens in phosphatgepufferter Salzlösung vom pH 7,2 werden mit einem gleichen Volumen von "vollständigem Freund's Hilfsstoff" emulgiert. Die ursprüngliche Dosis beträgt 1,6 ml, wobei 0,4 ml in jeden Fußballen injiziert werden. Eine zusätzliche Injektion von 100 μ g des Antigens im Hilfsstoff wird alle 6 bis 8 Wochen verabreicht, 25 μ g in jeden Fußballen. 5 bis 7 Tage nach den zusätzlichen Injektionen wird Blut abgenommen und das den Antikörper enthaltende Serum durch Zentrifugieren abgetrennt.

B e i s p i e l 3

Radioimmunoanalyse

Die Radioimmunoanalyse wird so durchgeführt, daß man verschiedene Verdünnungen von gemäß Beispiel 2 hergestellten Antiseren in Gegenwart von 8×10^{-4} μ c [^{14}C] Pentobarbitalnatrium (New England Nuclear, 4,13 mc/mM) etwa 1000 Impulse/min, bei 4°C über Nacht brütet. Nach dem Brüten werden alle Gläser mit einer neutralen gesättigten Ammoniumsulfatlösung (gleiches Volumen wie das Brütmedium) versetzt. Der Niederschlag, der das Antikörper-gebundene Pentobarbital enthält, wird 2 mal mit dem gleichen Volumen an 50-prozentigem gesättigtem Ammoniumsulfat gewaschen und dann in 0,5 ml eines handelsüblichen, lösungsvermittelnden wie "NCS solubilizer", gelöst sowie quantitativ in ein

Flüssigkeits-Szintillationsspektrometer ("Packard Tri-Carb") überführt und ausgezählt. Dasjenige Glas, das radioaktives Pentobarbital und Antiserum, jedoch kein unmarkiertes Pentobarbital enthält, dient als Maß für die maximale Antikörper-gebundene Radioaktivität. Die Zugabe steigender Mengen von unmarkiertem Pentobarbital zu einer bestimmten Menge an markiertem Pentobarbital und Antiserum resultiert in einer konkurrierenden Inhibierung des markierten Pentobarbitals für die Bildung des Antikörper-Hapten-Komplexes. Die Ergebnisse sind in Tabelle I zusammengestellt.

Tabelle I

nicht-radioaktives, zugesetztes Pentobarbital (Nanogramm)	Inhibierung der Bindung von Pentobarbital- ¹⁴ C (%)
1	10
5	20
10	28
20	43
30	52
40	63

Die vorgenannten Ergebnisse zeigen deutlich die Empfindlichkeit des Verfahrens. Bei der Auftragung in graphischer Form erhält man aus den Daten der Tabelle I ein lineares Verhältnis zwischen der Menge an nicht-radioaktivem zugesetztem Pentobarbital und der gefundenen prozentualen Inhibierung. Die Zugabe von 5 Nanogramm Pentobarbital in dem Probenvolumen von 10 µl verursacht eine 20-prozentige Inhibierung der Bindung

der markierten Verbindung. Durch Verwendung größerer Probevolumina lässt sich eine größere Empfindlichkeit erreichen.

Bei der Durchführung von Vergleichsversuchen mit anderen Barbitursäurederivaten und Verbindungen, die der Barbitursäure in der Struktur etwas ähnlich sind, zeigt sich, daß der Antikörper Barbital, Pentobarbital und Phenobarbital, die sich nur in den Substituenten in der C₅-Stellung unterscheiden, anzuzeigen vermag. Im Gegensatz dazu tritt bei ähnlichen Konzentrationen keine Bindung von Hexobarbital oder Thiopental ein, die einen 1-Methyl- bzw. 2-Thio-Substituenten aufweisen.

Patentansprüche

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Antigen, im wesentlichen bestehend aus einem 5-substituierten, 1,3-nicht-substituierten Barbitursäurederivat, das über den 5-Substituenten mit einem immunisierenden Trägerstoff verbunden ist, wobei der immunisierende Trägerstoff die Eigenschaft besitzt, bei seiner Injizierung selbständig eine immunisierende Wirkung in einem Wirtstier hervorzurufen.
2. Antigen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Barbitursäurederivat über eine Peptidbindung mit einem Protein verbunden ist.
3. Antigen nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Carbonylgruppe der Peptidbindung von dem Barbitursäurederivat stammt.
4. Antigen nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß pro Molekül Protein 2 bis 3 Barbitursäurederivat-Reste gebunden sind.
5. Antigen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Barbitursäurederivat über eine Peptidbindung mit einem Polypeptid verbunden ist.
6. Antikörper, bestehend aus dem Protein einer γ -Globulin-Fraktion, das eine Vielzahl von Zentren aufweist, die selektiv mit einer 5-substituierten-1,3-nicht-substituierten Barbitursäure oder einem Antigen, das im wesentlichen aus einer 5-substituierten-1,3-nicht-substituierten Barbitursäure, die über den 5-Substituenten mittels einer Peptidbindung mit einem Protein

oder Polypeptid verbunden ist, unter Komplexbildung reagieren.

7. Antikörper nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein der γ -Globulin-Fraktion ein Molekulargewicht von etwa 160 000 aufweist.

8. Verfahren zur Bestimmung eines 5-substituierten-1,3-nicht-substituierten Barbitursäurederivats in einer Probe, dadurch gekennzeichnet, daß man die Probe zu einer Lösung gibt, die eine bekannte Menge eines markierten 5-substituierten-1,3-nicht-substituierten Barbitursäurederivats und einen Antikörper enthält, der spezifisch für 5-substituierte-1,3-nicht-substituierte Barbitursäurederivate ist und aus einem Protein einer γ -Globulin-Fraktion besteht, das eine Vielzahl von Zentren aufweist, die selektiv mit dem 5-substituierten-1,3-nicht-substituierten Barbitursäurederivat unter Komplexbildung reagieren, die prozentuale Inhibierung der Bindung des markierten, 5-substituierten-1,3-nicht-substituierten Barbitursäurederivats mißt und

die Menge an in der Probe vorhandenem 5-substituierten-1,3-nicht-substituierten Barbitursäurederivat bestimmt, indem man den prozentualen Inhibierungswert mit einer Standardkurve vergleicht, die durch Hinzufügen bekannter Mengen des 5-substituierten-1,3-nicht-substituierten Barbitursäurederivats zu einem bestimmten Gemisch aus dem markierten 5-substituierten-1,3-nicht-substituierten Barbitursäurederivat und dem Antikörper erhalten worden ist, und die prozentuale Inhibierung der Bindung für jede bekannte Menge des 5-substituierten-1,3-nicht-substituierten Barbitursäurederivats bestimmt.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß man das Verfahren radioimmunologisch durchführt.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man ein markiertes 5-substituiertes-1,3-nicht-substituiertes Barbitursäurederivat aus der Gruppe Pentobarbital-¹⁴C, Phenobarbital-¹⁴C und Barbital-¹⁴C verwendet.

11. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man als 5-substituiertes-1,3-nicht-substituiertes Barbitursäurederivat in der Probe Pentobarbital verwendet.

12. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man als 5-substituiertes-1,3-nicht-substituiertes Barbitursäurederivat in der Probe Phenobarbital verwendet.

13. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man als 5-substituiertes-1,3-nicht-substituiertes Barbitursäurederivat in der Probe Barbital verwendet.

14. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man die Messung der prozentualen Inhibierung der Bindung der markierten 5-substituierten-1,3-nicht-substituierten Barbitursäure mittels Flüssigkeits-Szintillationszählung vornimmt.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.